

Aus dem Institut für Klinische Virologie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. B. Fleckenstein

Vergleichende
elektronenmikroskopische, biochemische
und serologische Untersuchungen
zur Infektion mit
humanpathogenen Warzenviren

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Ingrid Herholz
geb. Dreger
aus Roth

1980 #327

Aus dem Institut für Klinische Virologie
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. B. Fleckenstein

**Vergleichende
elektronenmikroskopische, biochemische
und serologische Untersuchungen
zur Infektion mit
humanpathogenen Warzenviren**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Ingrid Herholz
geb. Dreger
aus Roth

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten

Referent: Prof. Dr. B. Fleckenstein

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.1980

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	8
1. Biopsien	8
2. Reagentien	8
3. Enzyme	9
4. Lösungen	9
5. Geräte	10
6. Reinigung von Viruspartikeln aus Vulgär- und Plantarwarzen	10
7. Reinigung viraler DNA aus Viruspartikeln	12
8. Transkription viraler DNA in vitro mit der Escherichia coli Polymerase	13
9. Extraktion zellulärer DNA	14
10. DNA-RNA-Hybridisierungen auf Filtern	14
11. Elektronenmikroskopische Agglutination	15
12. Präparation für die Elektronen- mikroskopie	17
C. Ergebnisse	18
I) Hybridisierungen	18
II) Serologie	24
D. Diskussion	27
I) Hybridisierungen	27
II) Serologie	34
E. Zusammenfassung	40

F. Tabellen	42
1. Ergebnisse der Hybridisierungen	42
2. Ergebnisse der EM-Agglutinationsversuche	
a) Seren der Warzenträger	45
b) Kontrollseren	47
G. Literatur	48

Einleitung

Die zu den DNS-Viren gehörenden Papillomviren, die mit dem Polyoma-Virus und dem SV-40-Virus die Gruppe der Papova-Viren bilden, rufen beim Menschen Epitheliome bzw. Fibroepitheliome hervor, die sich im Bereich der Haut als Warzen (*Verrucae vulgares*, *verrucae plantares* und *palmares*, *verrucae planae* und *verrucae filiformes*), auf der Mundschleimhaut als Papillome (z.B. *juvenile Larynxpapillome*) und auf den Schleimhäuten des Genitales als spitze Kondylome (*Condylomata acuminata*) manifestieren. Diese häufig vorkommenden Neubildungen zeigen zwar gewisse histologische Unterschiede, besitzen aber die gemeinsame Eigenschaft, daß trotz epithelialer und papillärer Wucherung die Basalzellschicht erhalten bleibt (ROWSON und MAHY, 1967) und maligne Entartung nur selten beobachtet wird (ZUR HAUSEN, 1977).

Die virale Genese menschlicher Warzen ist etwa seit der Jahrhundertwende bekannt. Die Übertragbarkeit der Warzen von Mensch zu Mensch wurde 1896 von JODASSOHN festgestellt (NASEMANN, 1974). 1907 gelang es CIUFFO durch Inokulation zellfreier Filtrate in die Haut von Freiwilligen Warzen zu erzeugen (ROWSON, 1967), ein erster Hinweis auf die Virusgenese menschlicher Warzen. Nach der Inokulation von Extrakten aus Kondylomen (WAELSCH 1918, SERRA 1924, GOLDSCHMIDT und KLIGMAN 1958) und juvenilen Larynxpapillomen (ULLMANN 1923, ISHIKAWA 1936) in verschiedene Körperstellen entwickelten sich nach einer Inkubationszeit von 3 bis 6 Monaten typische Papillome, die sich histologisch nicht von normalen Warzen unterschieden. Umgekehrt ergab die Injektion von Extrakten aus Vulgärwarzen in die Genitalregion typische Kondylome (GOLDSCHMIDT und KLIGMAN 1958).

Diese Ergebnisse waren gut mit der Beobachtung in Einklang zu bringen, daß plane Warzen in vulgäre übergehen können (NASEMAN 1974), Larynxpapillome und Gesichtswarzen, sowie Kondylome und Vulgärwarzen häufig zusammen auftreten (FREY 1924) und Kinder mit Plantarwarzen doppelt so häufig Warzen an anderen Körperteilen entwickeln wie Kinder ohne Plantarwarzen (East Anglican Branch of the Society of Medical Officers of Health 1955). Es konnten auch elektronenmikroskopisch in Vulgärwarzen und Kondylomen Viruspartikel nachgewiesen werden, die eine typische Morphologie aufwiesen (MELZCER 1965).

All diese Ergebnisse führten zu der Annahme, daß die verschiedenen Warzentypen von ein und demselben Virus verursacht werden (FREY 1924, WAELSCH und HABERMANN 1924, YOUNG 1964, ROWSON und MAHY 1967, NASEMAN 1974). Die verschiedenartigen klinischen Erscheinungsbilder wurden als unterschiedliche Stadien des pathologischen Prozesses oder als von der Lokalisation abhängige unterschiedliche Reaktionen interpretiert (NASEMAN 1974, ROWSON und MAHY 1967). Diese Auffassung führte verständlicherweise zu einem gewissen Desinteresse an der Suche nach spezifischen Virustypen. Hinzu kam die Tatsache, daß Anzüchtungsversuche bei menschlichen Papillomviren fehlschlagen und die Suche nach spezifischen, warzenvirusinduzierten Tumorantigenen erfolglos war.

Anhalt für die Existenz unterschiedlicher Warzenvirustypen beim Menschen ergab sich erst in jüngster Zeit:

- Serologische Untersuchungen durch Darstellung von Viruspartikelagglutination im Elektronenmikroskop ergaben nur einseitige Kreuzreaktivität zwischen Viren aus normalen Warzen und Viren aus Kondylomen (ALMEIDA et al. 1969).
- Komplementäre RNA, die durch Transskription aus der viralen DNA von Plantarwarzen erhalten wurde, hybridisierte

nicht mit DNA aus Kondylomen und Larynxpapillomen (ZUR HAUSEN et al. 1974).

- Die Altersverteilung von Patienten mit Vulgärwarzen, Kondylomen und Larynxpapillomen zeigt deutliche Unterschiede (ZUR HAUSEN et al. 1976).
- Die Spaltungsmuster nach Behandlung von viraler DNA aus Vulgärwarzen und Plantarwarzen mit verschiedenen Restriktionsenzymen sowie die Untersuchung viraler Proteine durch Elektrophorese und serologische Tests beweisen die Existenz verschiedener Typen humaner Papillomviren. Drei der bisher entdeckten Typen scheinen nahe verwandt zu sein, während ein vierter sich in Basenzusammensetzung und Antigeneigenschaften stark von den anderen unterscheidet. Elektronenmikroskopisch sind die verschiedenen Warzentypen nicht zu unterscheiden, es existiert jedoch keine Kreuzreaktivität zwischen Typ I und Typ IV (GISSMANN und ZUR HAUSEN 1976, GISSMANN et al. 1977, PFISTER und ZUR HAUSEN 1978).

Tumurviren besitzen die in ihrem Genom fixierte besondere Eigenschaft, Zellen zur Proliferation anzuregen, sie zu transformieren und können dadurch im Makroorganismus autonom proliferierende Prozesse auslösen. Transformierte Zellen unterscheiden sich von normalen Zellen und auch von Zellen, die durch nicht onkogene Viren infiziert sind, in einigen wesentlichen Eigenschaften: sie haben die sogenannte Kontaktinhibition verloren, zeigen erhöhte Teilungsbereitschaft und charakteristische Veränderungen im Zellstoffwechsel und induzieren nicht zuletzt die Bildung neuer Antigene. Das Virusgenom wird bei der Transformation meist total oder partiell in das Zellgenom inkorporiert, eine Virusproduktion findet nach Transformation durch DNA-haltige Tumurviren nicht statt (STARKE und HLINAK 1972).

Humane Papillomviren besitzen, wie die zur gleichen Gruppe gehörenden Polyoma- und SV-40-Viren, die Fähigkeit, Zellen zu transformieren, wenn auch mit sehr geringer Effektivität (TOOZE 1973). Das Virus kann mit elektronenmikroskopischen Methoden in den sich teilenden Zellen der Basalzellschicht nicht nachgewiesen werden, während es in den äußeren, keratinisierten Schichten in großer Zahl gefunden wird. Man nimmt an, daß das Virus in den proliferierenden Zellen in einer Provirusform vorliegt, bei Beginn der Keratinisierung das Wirtschromosom verläßt und ein lytischer Zyklus beginnt (TOOZE 1973).

Menschliche Warzen scheinen mit Ausnahme der Kondylome (FIALKOW et al. 1976) im allgemeinen monoklonaler Herkunft zu sein, das heißt, eine Warze entsteht aus einer einzigen transformierten Zelle, wobei das persistierende Virusgenom bei der Zellteilung weitergegeben wird (MURRAY et al. 1972).

Die Persistenz viraler Nukleinsäuren innerhalb von Tumorzellen kann durch die Untersuchung von Nukleinsäurehomologien zwischen Virus-DNA und Tumorzell-DNA nachgewiesen werden. Man verwendet dabei entweder gereinigte, radioaktiv markierte Virus-DNA oder (wie bei den folgenden Untersuchungen) radioaktiv markierte, virusspezifische komplementäre RNA (cRNA), die mit Hilfe der E.coli-Polymerase in vitro synthetisiert wird. Durch Erhitzen wird die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den beiden DNA-Strängen der gereinigten zellulären Test-DNA zerstört, so daß die cRNA sich unter geeigneten Testbedingungen an komplementäre Sequenzen der DNA binden kann. Die gemessene Radioaktivität ist ein Maß für die Anzahl von viralen Genomäquivalenten innerhalb der untersuchten Zellen. DNA-DNA- sowie DNA-cRNA-Hybridisierungen erwiesen sich als wertvolles Hilfsmittel zum Nachweis geringer

Konzentrationen von Virus-DNA in Zellen, die kein Virus produzieren. Sie ermöglichten die Entdeckung von Epstein-Barr-Virusgenomen in Biopsien von Burkitt-Lymphomen und Nasopharynxkarzinomen (ZUR HAUSEN und SCHULTE-HOLTHAUSEN 1970, ZUR HAUSEN et al. 1970) und wurden bereits mit Erfolg beim Nachweis von humanem Papillomvirusgenom (HPV-Genom) in verschiedenen Warzentypen eingesetzt (ZUR HAUSEN et al. 1974). Nachdem in jüngster Zeit zahlreiche Hinweise auf die Existenz verschiedener Typen in der Gruppe der HPV vorliegen (GISSMANN und ZUR HAUSEN 1976, GISSMANN et al. 1977, PFISTER und ZUR HAUSEN 1978), müssen die Resultate früherer Arbeiten neu bewertet werden. Im ersten Teil dieser Arbeit sollen daher die Ergebnisse von Hybridisierungsversuchen mit cRNA vom Haupttyp menschlicher Warzenviren und zellulärer DNA aus Plantar- und Vulgärwarzen dargestellt werden.

Der klinische Verlauf von Warzeninfektionen ist sehr unterschiedlich: Warzen können sich innerhalb kurzer Zeit spontan zurückbilden oder auch jahrelang bestehen bleiben. Sie können verschwinden - bei mehreren Warzen alle gleichzeitig oder auch nur einzelne (ROWSON 1967) - und können an derselben Stelle oder an anderen Stellen wieder auftauchen. Bei diesen Vorgängen spielt offensichtlich die Immunitätslage des Warzenträgers eine wichtige Rolle. 1963 entdeckte ALMEIDA als erste mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden virusspezifische humorale Antikörper bei menschlichen Warzenträgern (ALMEIDA et al. 1963). Zahlreiche andere Autoren konnten diesen Befund reproduzieren (GOFFE 1966, OGILVIE 1970, CUBIE 1972, PYRHÖNEN und PENTTINEN 1972, MATTHEWS und SHIRODORIA 1973, WARWICK und MORISON 1975, PFISTER und ZUR HAUSEN 1978), wobei die Titerhöhe jeweils deutliche Unterschiede aufwies, zum Teil wohl aufgrund unterschiedlicher Methoden

und verschiedener Versuchsbedingungen. Untersuchungen über die Funktion der zellulären Immunität und der Titerveränderungen, die im Verlauf spontaner Rückbildungen auftraten, erbrachten widersprüchliche Ergebnisse. Entsprechend unterschiedlich wird die Rolle, die humorale Antikörper bei der Rückbildung von Warzen und der Wahrscheinlichkeit für Neuinfektionen spielen, beurteilt.

Serologische Untersuchungen sind nach wie vor durch das Fehlen von geeigneten In-vitro-Systemen behindert. Auch die Suche nach nichtstrukturellen Virusantigenen erwies sich bis jetzt als mühsam. Bei der Untersuchung der antigenen Eigenschaften von Warzengewebe wurden zwar zwei nichtstrukturelle Antigene gefunden, die auch in anderen Tumoren und in fetalem Gewebe vorkamen, in normalem menschlichen Gewebe aber nur in äußerst geringen Mengen (PASS und MAIZEL 1973, PASS und MARCUS 1973), sie scheinen jedoch eher embryonale Antigene zu sein. Die in den meisten anderen von Viren verursachten Tumoren nachweisbaren Kern-(T) und Oberflächenantigene (TSTA bzw. TSSA) wurden bei HPV noch nicht entdeckt.

Angeichts dieser Tatsachen erscheint die Suche nach humoralen Antikörpern bei Warzenträgern nach wie vor sinnvoll, dies um so mehr, als die jüngst erwiesene Heterogenität der HPV, von denen zumindest Typ I und Typ IV nicht kreuzreagieren, Ergebnisse früherer Untersuchungen in einem neuen Licht erscheinen läßt. Bei sehr vielen dieser Experimente waren als Antigen nämlich Viruspartikel verschiedener Warzen verwendet worden, möglicherweise also Mischungen verschiedener Typen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit werden daher die Ergebnisse von Antikörperuntersuchungen bei Warzenträgern mit definiertem HPV-I-Antigen dargestellt. Der Anti-

körpernachweis wurde mit Hilfe der zuerst von ALMEIDA beschriebenen Methode der elektronenmikroskopischen Agglutination (EM-Agglutination) von Viruspartikeln durchgeführt (ALMEIDA et al. 1963).

Um Hinweise zur Epidemiologie von HPV I zu erhalten, wurde mit der gleichen Technik und demselben Typ-I-Antigen auch der Antikörperspiegel einer Normalpopulation gemessen, die die gleiche Altersverteilung wie die Gruppe der Warzenträger besaß. Angesichts des häufigen Vorkommens von Warzen und des großen wissenschaftlichen Interesses gerade an serologischen Aspekten von HPV-Infektionen ist es erstaunlich, daß epidemiologische Untersuchungen über die Häufigkeit von Warzeninfektionen und die Existenz von virusspezifischen Antikörpern in der Bevölkerung bis jetzt noch nicht durchgeführt worden sind. Der Nachweis von Antikörpern wurde in allen bis jetzt veröffentlichten Arbeiten bei Patienten mit Warzen oder bei Personen mit positiver Warzenanamnese durchgeführt; wenn Kontrollgruppen verwendet wurden, dann Personen, die angaben, nie Warzen gehabt zu haben (OGILVIE 1970, CUBIE 1972) oder Säuglinge von 6 bis 12 Monaten (PYRHÖNEN und PENTTINEN 1972). Andere wissenschaftliche Arbeiten, die sich mit der Epidemiologie von Warzen beschäftigen, verwendeten meist altersmäßig begrenzte Gruppen, wie Schüler (BENZ und GILLIET 1976), Kinder in Heimen (MASSING und EPSTEIN 1963) oder Rekruten (PASTINSZKY 1958). Lediglich eine Arbeit, die das auffallend häufige Auftreten von Vulgärwarzen in bestimmten Berufsgruppen untersucht, verwendet als Vergleichsgruppe eine in etwa repräsentative Normalpopulation (BOSSE und CHRISTOPHERS 1964).

Material und Methoden

Biopsien

Die verwendeten Warzenpräparate (Plantar- und Vulgärwarzen) wurden dankenswerterweise von der Dermatologischen Universitätsklinik Erlangen und Herrn Dr. Schmidt, Erlangen, zur Verfügung gestellt. Sie wurden in der Reihenfolge ihres Eingangs mit WV 1, 2 usw. bezeichnet, nach ihrer Entfernung in Reagenzgläsern mit Gewebekulturmedium aufbewahrt und nach dem Transport entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert. Nach den Untersuchungen von BARRERO-ORO et al. können Warzen bei dieser Temperatur ohne nennenswerte Verluste an Viruspartikeln über mehrere Monate aufbewahrt werden (BARRERO-ORO et al. 1962).

Reagentien

- Nitrozellulosefilter, 0,45 um Porenweite
Sartorius, Göttingen
- Sephadex G 50
Pharmacia Fine Chemicals, Frankfurt/Main
- Tritium-markiertes Cytidintriphosphat (CTP)
Amersham Buchler, Braunschweig
- Triton X 100
Röhm und Haas, Frankfurt/Main
- Visking Dialyseschlauch
Union Carbide, Chicago, USA
- Athidiumbromid, Spermidin, Uridintriphosphat (UTP),
Guanosintriphosphat (GTP)
Serva, Heidelberg
- alle anderen Chemikalien von Merck, Darmstadt

Enzyme

- Trypsin aus Rinderpankreas, 1:250
Difco, Detroit, USA
- Proteinase K aus Pilzen, chromatographisch gereinigt
Merck, Darmstadt
- Ribonuklease (RNase) aus Pankreas, elektrophoretisch
gereinigt
Merck, Darmstadt

Lösungen

- MEM, minimal essential medium
Grand Island Biological Co., Grand Island N.Y., USA
- TT33 Szintillator:
40 g PPO, 2 g POPOP, 3,33 l Triton X-100, 6,66 l Toluol
- 20 X SSC (Stammlösung, die vor Gebrauch entsprechend
verdünnt wurde):
3 M NaCl (=175,32 g), 0,3 M Natriumcitrat (=88,23 g),
ad 1000 ml H₂O
- PBS, phosphate buffered saline :
8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄,
0,167 g CaCl₂ x 4 H₂O, 0,1 g MgCl₂ x 6 H₂O,
ad 1000 ml H₂O
- Trypsin-Lösung:
8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,1 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O,
1 g D(+)Glucose, 3 g Tris, 2,5 g Trypsin,
5 mg Phenolrot, pH 7,5, ad 1000 ml H₂O
- Tris-EDTA :
10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan = 1,21 g
0,1 mM EDTA (Äthylendinitilotetraessigsäure, Dinatrium-
salz) = 0,037 g, ad 1000 ml H₂O, mit HCl auf pH 8,1
eingestellt. wurde vor Gebrauch aus einer 100 fach
konzentrierten Stammlösung verdünnt.

Geräte

- Zentrifugen:
Christ, UJ III S und Hettich, Rotosilenta K
- Ultrazentrifugen:
Beckman, L 3-50 und L 5-50 mit SW 27 und SW 56 Rotoren
- Szintillationszähler:
Packard, Tricarb 3375 und Berthold und Friseke, Betaszint 5000
- Spektralphotometer:
Zeiss, PMQ II und Gilford 240
- Elektronenmikroskop: Zeiss 10
- Lyophilisiergerät: Gardiner, New York, USA
- Refraktometer nach Abbe: Zeiss 88396

Reinigung von Viruspartikeln aus Vulgär- und Plantarwarzen

Jede Warze wurde dreimal in 0,15 M NaCl geschwenkt, mit einer Schere in kleine Stücke geschnitten und mit Seesand unter Zugabe von 2 - 5 ml Natriumphosphatpuffer, 1 M NaCl pH 8,0 zermörsert. 0,1 % Trypsin wurde zugegeben und die Suspension 1 h bei 37 °C gemischt (FAVRE et al. 1975).

Nach Zentrifugation (15 min bei 3500 x g und 4 °C) wurde der Überstand auf Viruspartikel untersucht. Zu diesem Zweck wurden Präparate für das Elektronenmikroskop angefertigt und die durchschnittliche jeweilige Partikelzahl pro Feld des Kupfernetzes notiert.

Bei viruspositiven Isolaten wurde das Sediment anschließend mit gleichem Puffer resuspendiert und erneut bei 3500 x g und 4 °C 15 min. lang zentrifugiert. Das Sediment der beiden Zentrifugationen wurde zur Extraktion der zellulären DNA weiterverwendet. Die vereinigten Überstände wurden anschließend für 75 Minuten bei 4 °C und 80 000 x g in einem SW 27 Rotor zentrifugiert. Das Sediment wurde in 3 ml 0,05 M Natriumphosphatpuffer, 0,05 M NaCl, 0,001 M EDTA, pH 7,4 resuspendiert und die Lösung mit festem CsCl auf eine Dichte von 1,34 g/ml eingestellt. Zur Berechnung der CsCl-Einwaage wurde die Formel von ROBINSON und STOKES (1955) verwendet:

$$g \text{ CsCl}/100 \text{ ml Lösung} = 137,48 \times \text{Eingangsdichte} - 138,11$$

Nach Gleichgewichtszentrifugation im SW 56 Rotor bei 110 000 x g über 40 Stunden bei 20 °C wurden die Röhrchen von unten mit einer Kanüle angestochen und der Gradient in Fraktionen von etwa 200 µl gesammelt. Um den Verlauf des CsCl-Gradienten zu bestimmen, wurden je 10 µl einiger Fraktionen refraktometrisch vermessen und die Dichte (ρ) aus dem refraktiven Index (n_D^{25}) wie folgt berechnet:

$$\rho = 10,800 n_D^{25} - 13,500 \quad (\text{WEIGLE et al. 1959})$$

Anschließend wurden alle Fraktionen mit 200 µl Wasser aufgefüllt und die optische Dichte bei 280 nm gemessen. Die Fraktionen mit einer Dichte von 1,32 - 1,34 g/ml (Partikel mit DNS) bzw. 1,29 g/ml (leere Partikel) wurden getrennt gesammelt und gegen 3 x 2 l Tris-EDTA dialysiert.

Bei Isolaten mit hoher Viruskonzentration zeigten sich nach CsCl-Gleichgewichtszentrifugation zwei sichtbare Banden symmetrisch zur Mitte des Röhrchens. Diese wurden durch seitliches Anstechen des Röhrchens gesammelt und wie oben beschrieben dialysiert.

Reinigung viraler DNA aus Viruspartikeln

Zu der gegen Tris-EDTA dialysierten Virussuspension wurde 25 %iges Natriumdodecylsulfat (SDS) zugegeben (Endkonzentration 1 %) und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von festem CsCl (Endkonzentration 1 M) wurden die Proteine durch Zentrifugation bei 2000 x g und 0 °C für 30 Minuten abgetrennt (TAI et al. 1972). Um die kovalent geschlossene DNA (Komponente I) von der zirkulären (Komponente II) bzw. der linearen (Komponente III) abzutrennen, wurde der Überstand nach Dialyse gegen Tris-EDTA mit festem CsCl auf eine Dichte von 1,56 g/ml gebracht und mit Äthidiumbromid (200 µg/ml) bei 110 000 x g für 40 Stunden bei 20 °C im SW 56 Rotor zentrifugiert (RADLOFF et al. 1967). Die unter UV-Licht sichtbaren DNA-Äthidiumbromidbanden bei einer Dichte von 1,60 g/ml (Komponente I) und 1,56 g/ml (Komponenten II + III) wurden getrennt gesammelt und das Äthidiumbromid durch dreimalige Extraktion mit wassergesättigtem n-Butanol aus der wässrigen Phase entfernt. Die DNA wurde nach Extraktion mit Äther gegen 3 x 2 l Tris-EDTA dialysiert und in einem Spektralphotometer bei Wellenlängen zwischen 220 und 320 nm gemessen. Die Konzentration wurde aus der Extinktion bei 260 nm bestimmt ($1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg/ml}$).

Transkription viraler DNA in vitro mit der Escherichia coli Polymerase

Zur Herstellung komplementärer RNA (cRNA) wurden 0,2 bis 0,5 µg viraler DNA nach der Vorschrift von WOLF (1974) transkribiert. Dazu wurde nach Möglichkeit gereinigte Komponente I eingesetzt. Nur bei Virusisolaten mit geringer DNA-Ausbeute wurde auf einen CsCl-Äthidiumbromidgradienten verzichtet und die Komponenten I + II zur Transkription verwendet.

Die Reaktion erfolgte bei 37 °C für 50 Minuten in Polymerasepuffer (0,04 M Tris-HCl, pH 7,7, 0,01 M MgCl₂, 0,1 mM Dithiothreitol, 0,2 M KCl, 0,5 mg/ml Rinderserumalbumin, 0,4 mM K₂HPO₄). Ein typischer Ansatz (0,6 ml) enthielt:

5 µg DNA (lyophilisiert)
40 nmol ³H-CTP (lyophilisiert)
40 nmol ³H-UTP (")
40 nmol ATP, 40 nmol GTP
20 mmol Spermidin
20 µl Polymerase (WOLF 1974)

Nach Beendigung der Reaktion wurde mit 50 µg/ml RNase (DNase-frei) und 40 µg/ml Hefe RNA inkubiert, um die DNA-Matrix zu verdauen. Zur Entfernung der Proteine wurde die Lösung anschließend mit gleichem Volumen Phenol (gesättigt mit Tris-EDTA) geschüttelt. Die synthetisierte RNA wurde dann über eine Säule mit Sephadex G-50 medium (38 x 1,3 cm) von den nicht eingebauten Triphosphaten getrennt und in 45 % Glycerin bei -20 °C aufbewahrt.

Extraktion zellulärer DNA

Das bei der Virusreinigung aufbewahrte Sediment wurde mit 4 ml Tris-EDTA resuspendiert und 1 ml 5 % SDS zugegeben. Nach erneutem Resuspendieren wurden die Proben eine Stunde bei Zimmertemperatur belassen und anschließend Proteinase K (30 min bei 37 °C vorinkubiert) in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml zugegeben. An eine einstündige Inkubation bei 37 °C schloß sich die Phenolextraktion an. Dazu wurde die Suspension mit etwa gleicher Menge Phenol (mit Tris-EDTA gesättigt) pH 8,1 überschichtet, 10 min lang kräftig geschüttelt und dann 10 min bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abtrennen der wässrigen Phase wurde diese erneut ein- bis zweimal phenolextrahiert. Dann folgte eine Behandlung mit RNase (20 µg/ml, 30 min bei 80 °C vorinkubiert), der sich wiederum eine einstündige Inkubation bei 37 °C und mehrmalige Phenolextraktionen anschlossen. Abschließend wurde eine mehrtägige Dialyse gegen Tris-EDTA durchgeführt und die Absorption bei Wellenlängen zwischen 220 und 320 nm gemessen.

DNA-RNA-Hybridisierungen auf Filtern

Jeweils zweimal 25 µg der zu untersuchenden zellulären DNA wurden mit 0,1 X SSC auf ein Volumen von 4 ml gebracht, 15 min lang im kochenden Wasserbad denaturiert und im Eisbad rasch abgekühlt. Durch Zugabe von je 1 ml 10 X SSC wurden die Proben auf eine Konzentration von 2 X SSC eingestellt und unter Anwendung eines sehr schwachen Unterdrucks durch ein zuvor in 2 X SSC eingeweichtes Nitrozellulosefilter gesaugt.

In Szintillationsgefäßen wurden die Filter anschließend 4 Stunden bei 80 °C getrocknet.

Die radioaktiv markierte cRNA wurde mit 0,1 X SSC auf eine Konzentration von etwa 10^6 cpm/ml gebracht, 10 min lang im kochenden Wasserbad denaturiert und im Eisbad abgeschreckt. Diese Lösung wurde im Verhältnis 1:10 mit Hybridisierungspuffer (2,6 X SSC, 56,5 ml Formamid, 0,5 % SDS) versetzt und dann jeweils 1 ml jedem Filter zugegeben. In den folgenden 6 Tagen wurden die Proben unter leichtem Schütteln bei 45 °C im Wasserbad inkubiert.

Anschließend wurden die Filter den Gefäßen entnommen, nacheinander dreimal in 250 ml 2 X SSC geschwenkt und auf dem Filtrationsgerät von beiden Seiten mit je 100 ml Tris-EDTA gewaschen. Die Filter wurden wieder in Szintillationsgefäße gelegt und 5 ml einer Lösung von 200 µg/ml RNase (vorinkubiert 30 min bei 80 °C) zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden die Szintillationsgefäße auf Eis gestellt und die Waschvorgänge wie oben wiederholt. Anschließend wurden die Filter 30 min bei 80 °C getrocknet, mit jeweils 10 ml TT33 versetzt und im Szintillationszähler vermessen.

Elektronenmikroskopische Agglutination

Die Agglutinationsversuche wurden nach dem von ALMEIDA et al. (1963) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Das bei -20 °C gelagerte Serum von Patienten, denen Plantar- oder Vulgärwarzen entfernt worden waren, wurde im Verhältnis 1:10 und 1:100 mit PBS (pH 7,2)

verdünnt. Die zwei Titerstufen sollten die Erfassung unterschiedlicher Antikörperkonzentrationen sichern, da sowohl bei Vorliegen von zu wenig Antikörpern als auch bei starkem Überschuß an Antikörpern keine Zusammenlagerung von Partikeln erfolgen kann (ALMEIDA et al. 1963). Jeweils 2 bis 3 μ l des verdünnten Serums wurden mit der gleichen Menge gereinigter Virussuspension (Konzentration ca. 10^8 Partikel pro ml) in einem Glasröhrchen vermischt, eine Stunde bei 37 °C inkubiert und 24 Stunden bei 4 °C gelagert. Schließlich wurden davon Präparate für die Elektronenmikroskopie angefertigt.

In gleicher Weise wurden 50 Seren behandelt, die im Rahmen der klinischen Diagnostik wegen anderer Krankheiten untersucht worden waren, bei denen Titerkontrollen vor und nach Impfungen durchgeführt worden waren o.ä. Sie stellten insofern ein in etwa repräsentatives Normalkollektiv dar. Die Auswahl erfolgte weitgehend zufällig, einziges Auswahlkriterium bildete das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme, da die Altersverteilung derjenigen der Warzenträger entsprechen sollte. Die Seren waren ebenfalls bei -20 °C gelagert worden.

Als negative Kontrolle diente fötales Kälberserum, als positive Kontrolle menschliches Serum von Warzenträgern, bei denen über die Komplementbindungsreaktion (KBR) eine hohe Konzentration an komplementbindenden Antikörpern gefunden worden war.

Präparation für die Elektronenmikroskopie

Es wurde das von BRENNER und HORNE (1959) beschriebene Verfahren des "negative staining" verwendet. Dazu wurde ein Tropfen der Virussuspension auf ein mit Kohle und Neopren beschichtetes Kupfernetz aufgetragen. Nach einigen Minuten wurde ein Tropfen Phosphorwolframsäure pH 7,0 auf das Kupfernetz gegeben. Nach einigen Sekunden wurde der größte Teil der Flüssigkeit vorsichtig mit Filterpapier abgezogen. Das Präparat wurde anschließend im Elektronenmikroskop untersucht.

Ergebnisse

I) Hybridisierungen

Von 134 Warzen, von denen die zelluläre DNA extrahiert worden war, enthielten 75 eine für Hybridisierungsexperimente ausreichende DNA-Menge. Diese 75 Warzen sind mit den zugehörigen Daten in Tabelle I aufgelistet. 41 davon waren Plantarwarzen, 31 Vulgärwarzen, bei dreien war die Herkunft nicht bekannt. 29 der Warzen waren bei männlichen Patienten entfernt worden, 43 bei



Abb. 1: Altersverteilung der Warzenpatienten

weiblichen, bei dreien war das Geschlecht nicht angegeben worden. Von 3 Patienten waren jeweils zwei Warzen entfernt worden.

Die Altersverteilung der Warzenträger ist aus Abb. 1 zu ersehen. Der jüngste Patient war 6, der älteste 67 Jahre alt. Das Durchschnittsalter betrug 23,9 Jahre. Auffällig ist der Gipfel zwischen dem 10. und 25. Lebensjahr und ein weiterer um das 40. Lebensjahr. Plantar- und Vulgärwarzen zeigten bezüglich der Altersverteilung keine signifikanten Unterschiede.

Die Anzahl der durch Elektronenmikroskopie in den Warzen gefundenen Partikel variierte stark. Es ergab sich folgende Verteilung:

o Partikel		10 Fälle	
1 bis 2	"	7	"
3 bis 5	"	22	"
6 bis 12	"	13	"
13 bis 25	"	4	"
26 bis 50	"	9	"
mehr als 50	"	10	"

Die Partikelzahlen entsprechen dabei den pro Feld des Kupfernetzes entdeckten Viruspartikel, wobei immer mindestens 5 Felder gründlich abgesucht wurden. Die Gruppeneinteilung ließ sich in den unteren Bereichen, d.h. bei geringen Partikelzahlen, durch Zählen relativ gut durchführen, während bei Partikelzahlen über 10 nur noch geschätzt wurde. Die gefundenen Partikelzahlen entsprechen einer Konzentration von 10^7 bis 10^9 Partikeln pro Milliliter (GISSMANN, persönliche Mitteilung).

Die Verteilung der Partikelzahlen getrennt nach Plantar- und Vulgärwarzen ist aus Abb. 2 ersichtlich. Außer einem etwas höheren Prozentsatz von Warzen mit hohen Partikelzahlen bei den Plantarwarzen bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Warzentypen.

Hinsichtlich der Partikelzahl in Abhängigkeit vom Alter fällt auf, daß in den beiden Gruppen mit den höchsten Partikelzahlen die Altersgruppen bis 20 Jahre deutlich überwiegen: 15 von 18 Patienten dieser beiden Partikelzahlgruppen waren jünger als 20 Jahre.

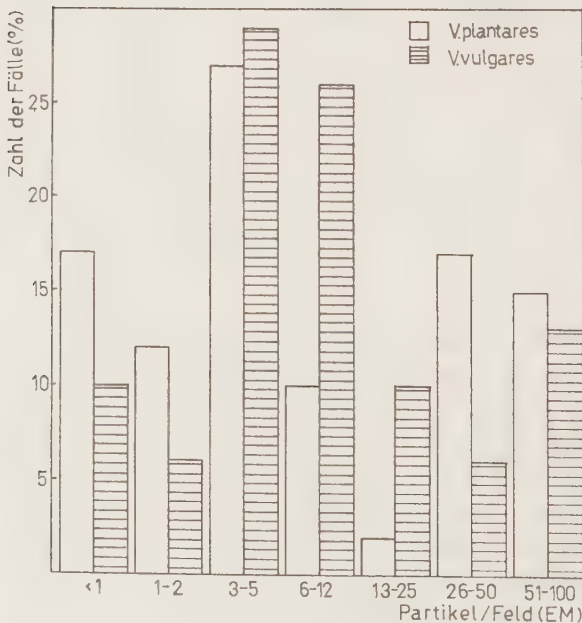


Abb. 2: Partikelzahlen in Plantar- und Vulgärwarzen

Bei den Hybridisierungen wurde in den meisten Fällen 25 µg der zellulären DNA einer Warze pro Filter verwendet. Bei geringerer DNA-Menge wurde mit DNA aus HEL-Zellen (human embryonic lung cells) auf 25 µg aufgefüllt und die gebundene Radioaktivität auf diese Menge umgerechnet. Dieses Vorgehen war insofern berechtigt, als durch frühere Untersuchungen (ZUR HAUSEN et al. 1974) nachgewiesen worden war, daß zwischen der Menge an viraler DNA und der gemessenen Radioaktivität eine lineare Beziehung besteht. Diese Linearität besteht allerdings nur bis zu einer Konzentration von 2,5 ng viraler DNA, was einer Radioaktivität von etwa 25 000 cpm oder 25 % der eingegebenen Radioaktivität entspricht. Bei höheren DNA-Mengen flacht die Kurve ab. Lag die gemessene Radioaktivität schon bei geringerer Menge an zellulärer DNA bereits im Bereich von 25 000 cpm und darüber oder wäre sie durch Umrechnung in diesen Bereich gekommen, so wurde auf die Umrechnung verzichtet; diese Warzen sind in Tab. I mit "x" gekennzeichnet. Ihre Hybridisierungsrate hätte bei Verwendung von 25 µg zellulärer DNA auf jeden Fall höher gelegen.

Die Hybridisierungsraten sind Tab. I zu entnehmen, sie entsprechen den erhaltenen Impulzzahlen, die in Prozent der eingegebenen Radioaktivität angegeben sind.

25 µg HEL-DNA dienten als negative Kontrolle. Ihre Hybridisierungsrate, die immer unter 0,1 % lag, wurde von den Hybridisierungsraten der untersuchten DNA-Proben abgezogen. Dies erklärt die sehr niedrigen Hybridisierungsraten einiger Warzen. Als positive Kontrolle diente eine Mischung aus 25 µg HEL-DNA und 2 bis 3 ng gereinigter Warzenvirus-DNA (Komponente II), die im erwarteten Bereich hybridisierte (im Durchschnitt etwa bei 23 %).

Auffallend ist zunächst der weite Bereich, in dem die Ergebnisse streuen. Von kaum meßbaren Impulsraten, die zum Teil unter denen der negativen Kontrollen lagen, bis zu Impulsraten, die fast 30 % der eingegebenen Radioaktivität betrugen, waren alle Bereiche, wenn auch nicht gleich stark, vertreten.

Es hybridisierten

51	Warzen	zu weniger als 5 %
4	"	" 6 bis 10 %
5	"	" 11 bis 15 %
5	"	" 16 bis 20 %
8	"	" 21 bis 25 %
2	"	" 26 bis 30 %

Es fällt auf, daß nicht nur Warzen mit hoher Partikelzahl, sondern auch Warzen, in denen sehr wenige Viruspartikel gefunden worden waren, teilweise hohe Hybridisierungsraten zeigen. Die Warze mit der höchsten Hybridisierungsrate liegt in der Gruppe, die elektronenmikroskopisch 3 bis 5 Partikel nachweisen ließ. Umgekehrt befinden sich in den Gruppen mit hohen Partikelzahlen einige Warzen, die negativ reagierten, d.h. deren Hybridisierungsrate unter 1 % liegt.

Trotz starker Streuung der Hybridisierungsrate innerhalb einzelner Gruppen zeigt sich, daß die jeweiligen Mittelwerte mit der Partikelzahl zunehmen (Abb. 3). Die Gruppen mit den niedrigen Partikelzahlen zeigen ein etwas abweichendes Verhalten.

Trotz der in etwa gleichen Partikelzahl in den beiden Warzentypen wurde von der DNA aus Plantarwarzen im Durchschnitt deutlich mehr cRNA gebunden als von der DNA aus Vulgärwarzen.

Insgesamt zeigte fast ein Drittel (24 von 75) der untersuchten Warzen Hybridisierungsraten von mehr als 5 %. Diese Grenze, oberhalb der alle Reaktionen als positiv bezeichnet werden, wurde festgesetzt, um unspezifische Reaktionen so weit wie möglich unberücksichtigt zu lassen.

Der Anteil der positiv reagierenden Warzen lag in der Gruppe der Plantarwarzen bei 41 %, in der Gruppe der Vulgarwarzen dagegen bei 19 %. In den Gruppen der 6-10- und 11-15-jährigen Papillomträger betrug der Anteil der positiv reagierenden Warzen 55,6 % bzw. 62,5 % und lag damit signifikant ($p < 0,05$) über dem Durchschnitt. Aus diesen beiden Altersgruppen stammte der überwiegende Teil der positiv reagierenden Papillome. Das Durchschnittsalter der Patienten mit solchen Warzen betrug 16,0 Jahre, das Durchschnittsalter aller Papillomträger 23,9 Jahre.

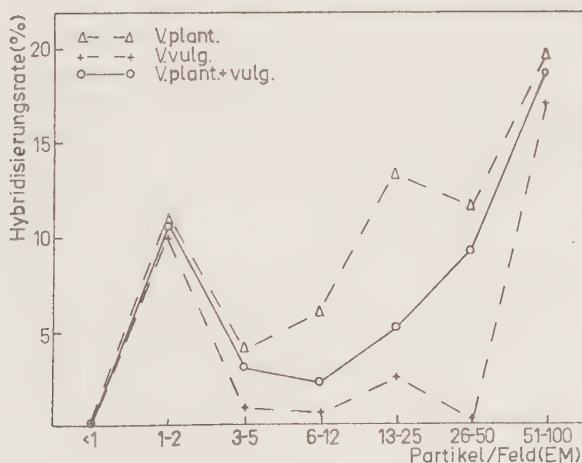


Abb. 3:

Hybridisierungsrate in Abhängigkeit von der Partikelzahl

II) Serologie

Bei den Agglutinationsversuchen wurden 14 Seren von Trägern von Plantarwarzen und 33 von Patienten mit Vulgärwarzen verwendet. Bei einem Patienten waren beide Warzenarten entfernt worden, bei zweien lagen keine Angaben vor.

Die Altersverteilung der Warzenträger, bzw. auch der Normalpopulation, ist aus Abb. 4 ersichtlich. Der jüngste Patient war 5, der älteste 81 Jahre, die meisten Fälle lagen in den beiden Gruppen zwischen 16 und 25 Jahren. Das Durchschnittsalter betrug 26,3 Jahre.

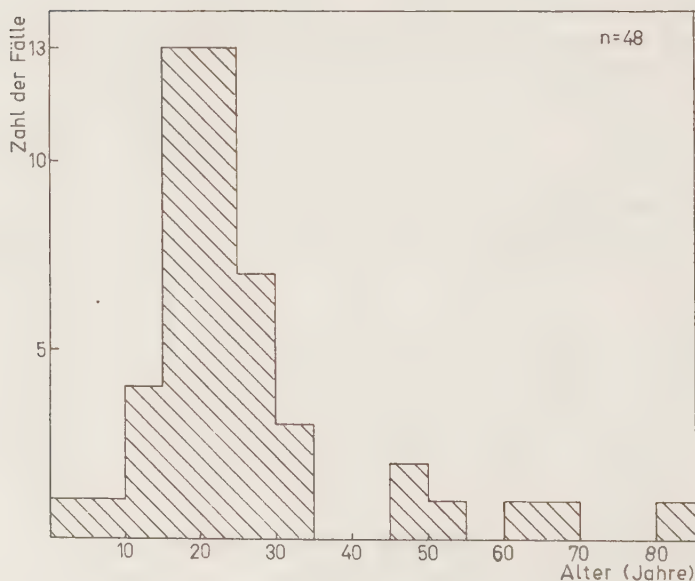


Abb. 4: Altersverteilung der Warzenpatienten

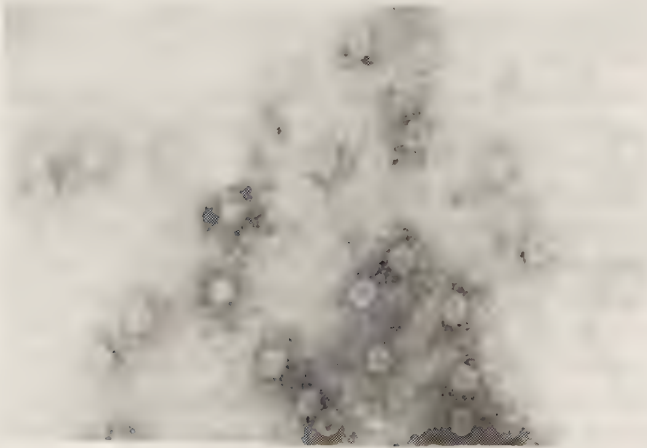
Bei dem Kontrollserum und der Mehrzahl der zu untersuchenden Seren lagen die Partikel im elektronenmikroskopischen Bild mehr oder weniger gleichmäßig verstreut. In Gegenwart von Antikörpern bildeten sich kleinere oder größere Agglutinate (Abb. 5).

Die Daten der untersuchten Seren sowie die Ergebnisse der Agglutinationsversuche sind Tabelle II zu entnehmen.

Bei den Warzenträgern waren 5 Seren nur bei Verdünnung 1:10 positiv, 2 nur bei Verdünnung 1:100, 6 Seren reagierten bei beiden Titerstufen. Insgesamt betrug der Anteil der positiven Seren, d.h. der Seren, die zumindest bei einer Titerstufe positiv waren, 26 % (13 Fälle). Die Zahl der positiven Reaktionen lag bei Verdünnung 1:10 etwas höher als bei Verdünnung 1:100 (22 bzw. 16 %). Die Seren von Patienten mit Plantarwarzen reagierten in 21 % (3 Fälle) positiv, bei den Trägern von Vulgärwarzen lag dieser Anteil mit 27 % (9 Fälle) etwas höher.

Bei der Normalpopulation waren 7 Seren nur bei der Titerstufe 1:10, 7 Seren nur bei 1:100 und 3 Seren bei beiden Titerstufen positiv. Insgesamt betrug hier der positive Anteil 34 % (17 Seren). Hinsichtlich der Altersverteilung der positiven Seren fanden sich keine Auffälligkeiten.

Abb. 5: Elektronenmikroskopische Darstellung von menschlichem Papillomvirus mit Hilfe der Negativkontrastierung (2 % PWS, pH 7,0)



a) Verstreut liegende Viruspartikel in Abwesenheit von HPV-I-spezifischen Antikörpern



b) Agglutination in Gegenwart von Antikörpern

Diskussion

I) Hybridisierungen

Die bei den Hybridisierungsversuchen verwendete Patientenzusammenfassung stimmt hinsichtlich der Altersverteilung im wesentlichen mit anderen epidemiologischen Untersuchungen überein (ZUR HAUSEN et al. 1976, RULISON 1942, PFISTER und ZUR HAUSEN 1978). Fast 60 % der Warzen waren bei Patienten zwischen 11 und 25 Jahren entfernt worden.

Auch die schon seit längerer Zeit bekannte Geschlechtsverteilung der Warzenträger konnte bestätigt werden (ROWSON und MAHY 1967). Das Verhältnis der weiblichen zu den männlichen Warzenträgern betrug 43 zu 29. Für dieses Phänomen konnte bis jetzt keine befriedigende Erklärung gegeben werden; es ist entgegen früheren Untersuchungen jedenfalls nicht darauf zurückzuführen, daß sich Frauen die Warzen eher entfernen lassen als Männer (RULISON 1942).

Bei unseren Untersuchungen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der in Vulgärwarzen und der in Plantarwarzen vorgefundenen Anzahl von Viruspartikeln. Da jedoch die Auswahl der Warzen insofern nicht repräsentativ ist, als bei der Warzenvirusisolierung bevorzugt Exemplare mit hoher Partikelzahl verwendet wurden, läßt sich dieser Befund nicht mit Ergebnissen früherer Arbeiten vergleichen, denzufolge in Plantarwarzen signifikant mehr Viruspartikel nachzuweisen sind als in Vulgärwarzen (OGILVIE 1970). Aus demselben Grund liegt auch der Anteil an Warzen, in denen keine Partikel gefunden werden konnten - bei unseren

Versuchen 13 % - bei nicht ausgewähltem Kollektiv höher, nach Untersuchungen Barrero-Oros bei 45 % (BARRERO-ORO 1962).

Ein Zusammenhang zwischen Geschlecht und Partikelzahl konnte nicht festgestellt werden, jedoch ein Zusammenhang zwischen Alter des Patienten und Partikelzahl. In Warzen jüngerer Patienten befinden sich im Durchschnitt mehr Viruspartikel als in denen älterer Patienten.

Leider war bei den uns eingesandten Warzen die Dauer der Infektion nicht angegeben, so daß die Frage nach einer Beziehung zwischen Infektionsdauer und Partikelzahl bzw. Hybridisierungsrate nicht beantwortet werden kann. Eine frühere Arbeit mit ähnlicher Fragestellung ergab eine Korrelation zwischen dem Alter der individuellen Warze und der in ihr vorgefundenen Partikelzahl, wobei in den Warzen, die 6 bis 12 Monate alt waren, die meisten Partikel zu finden waren (BARRERO-ORO 1962).

Was den Zusammenhang zwischen Hybridisierungsrate und Partikelzahl betrifft, müssen zunächst einige grundsätzliche Überlegungen angestellt werden. Das Molekulargewicht der diploiden menschlichen DNA beträgt 4×10^{12} (SOBER 1970), dasjenige der DNA des humanen Papillomvirus $5,3 \times 10^6$ (CRAWFORD 1965) bzw. nach neueren Erkenntnissen $4,9 \times 10^6$ (GISSMANN 1976). Einem viralen Genomäquivalent würden demnach bei 25 µg zellulärer DNA 0,035 bzw. 0,030 ng virale DNA entsprechen. Zwischen der Menge an viraler DNA und der Hybridisierungsrate besteht eine lineare Beziehung (ZUR HAUSEN et al. 1974), und zwar entsprechen 10^4 cpm einem Nanogramm viraler DNA. Demnach repräsentieren bei unseren Untersuchungen 350 cpm, das sind 0,35 % des Input (10^5 cpm), ein virales

Genomäquivalent. Diese Menge ist noch eindeutig nachweisbar. Allerdings muß dabei berücksichtigt werden, daß Fehlerquellen in den niedrigen Hybridisierungsbereichen eine gewisse Rolle spielen können, so daß eine eindeutig positive Reaktion erst ab einer bestimmten Höhe angenommen werden sollte. Die größte Menge an viraler DNA besitzt nach den vorhergehenden Überlegungen WV 930 mit 83 Genomäquivalenten.

Je mehr Partikel in den Warzen gefunden worden waren, desto höher lag im allgemeinen die gemessene Radioaktivität und damit auch die Anzahl viraler Genomäquivalente pro Zelle. Plantarwarzen zeigten dabei im Durchschnitt höhere Hybridisierungsraten als Vulgärwarzen, was auch schon bei früheren Untersuchungen aufgefallen war (ZUR HAUSEN et al. 1974). Die Tatsache, daß auch in den unteren Partikelbereichen einige Warzen hohe Hybridisierungsraten aufwiesen, beruht wahrscheinlich auf der mangelnden Genauigkeit der Partikelzählmethode, die sich vor allem in den unteren Bereichen auswirkt. Hinzu kommt, daß die in unseren Versuchen verwendete typenspezifische RNA die Virus-DNA eines anderen Typs nicht nachweisen läßt, was die Beziehung zwischen Partikelzahl und Hybridisierungsrate ebenfalls verfälschen muß. Für eine genauere Untersuchung dieser Beziehung wäre es demnach notwendig, genauere Zählmethoden zur Einschätzung der Partikelzahl und Warzen des gleichen DNA-Typs zu verwenden.

Insgesamt zeigte etwa ein Drittel (24 von 75) der untersuchten Warzen Hybridisierungsraten von mehr als 5 %. Diese Warzen enthalten entsprechend der verwendeten

c-RNA mit hoher Wahrscheinlichkeit DNA des Typs I. Es ist anzunehmen, daß auch in der Gruppe der Warzen mit niedrigeren Hybridisierungsraten zahlreiche Papillome, die durch denselben Typ verursacht sind, vorliegen, um so mehr, als frühere Untersuchungen ergaben, daß mindestens 70 % der Warzen dem Typ I zuzuordnen sind (GISSMANN et al. 1977).

Bei den Hybridisierungsversuchen zeigte sich ein auffallender Unterschied zwischen dem Verhalten der Plantar- und dem der Vulgärwarzen. Während bei den Plantarwarzen 41 % positiv reagierten und damit dem Typ I zuzurechnen sind, waren es bei den Vulgärwarzen nur 19 %. Eine kürzlich durchgeführte Untersuchung von 300 Vulgär- und Plantarwarzen, deren Typ durch die Reaktion ihrer Virusisolate mit Anti-HPV-I-Seren bestimmt worden war, erbrachte mit einem Anteil von 36 % bei den Plantar- und 16 % bei den Vulgärwarzen ähnliche Resultate (PFISTER und ZUR HAUSEN 1978). Dies stimmt auch gut mit Beobachtungen überein, wonach Typ I häufiger in Warzen mit hohen Partikelzahlen vorkommt und Plantarwarzen im allgemeinen höhere Partikelzahlen aufweisen als Vulgärwarzen (GISSMANN et al. 1977). Auch bei unseren Untersuchungen konnte dieser Zusammenhang bestätigt werden: alle 10 Warzenexemplare der Gruppe über 50 Partikel sind aufgrund ihrer Hybridisierungsraten dem Typ I zuzurechnen.

Auffallend ist weiterhin, daß der überwiegende Teil (60 %) der positiv reagierenden Papillome aus der Gruppe der 6 bis 15-jährigen stammte. Eine Untersuchung der Altersverteilung von über 500 Patienten mit Plantar- oder Vulgärwarzen, deren Typ charakterisiert worden war, ergab, daß Typ I vor allem in der Patientengruppe der 5 bis 15-jährigen dominierte und nach dem 15. Lebensjahr

sehr selten vorkam, während die durch Typ IV induzierten Warzen vor allem in der Altersgruppe der 20- bis 25-jährigen anzutreffen war (PFISTER und ZUR HAUSEN 1978).

Für die negativen Hybridisierungsergebnisse von zwei Drittel der untersuchten Warzen gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten:

1. Die vorhandenen Genomzahlen lagen unter der Nachweisgrenze.

Bei der Untersuchung der DNA von Zellen, die in vitro mit menschlichem Papillomvirus infiziert worden waren, konnte mit Hilfe der Reassoziationskinetik nur ein Bruchteil eines viralen Genomäquivalents pro Zelle nachgewiesen werden. Die Untersucher schlossen daraus, daß entweder jede Zelle nur einen Teil des Virusgenoms besitzt oder nur ein Teil der Zellen virale DNA aufgenommen hatte (LANCASTER und MEINKE 1975).

2. DNA aus negativ reagierenden Warzen enthält einen anderen Virustyp.

Die DNA mindestens eines anderen Virustyps, der nach dem Zeitpunkt seiner Entdeckung als Typ IV bezeichnet wurde, unterscheidet sich wesentlich von der DNA der Typen Ia, Ib und Ic. Sie hybridisiert nicht mit cRNA dieser Typen.

Ausgehend von der engen Beziehung zwischen Partikelzahl und Menge des vorhandenen Genoms ist bei negativ reagierenden Warzen mit hoher Partikelzahl das Vorliegen eines anderen Virustyps anzunehmen. Bei Exemplaren mit niedrigen Partikelzahlen ist, wie bereits ausgeführt, auch eine zu niedrige virale DNA-Menge als Ursache für eine mangelnde Hybridisierung in Betracht zu ziehen. Andererseits ist nach neuesten Untersuchungen gerade in Warzen mit niedriger Partikelzahl Typ IV überpro-

portional stark vertreten (GISSMANN et al. 1977).

Bei zwei Warzen der Gruppe mit 13 bis 25 Partikeln und fünf der Gruppe mit 26 bis 50 Partikeln ist aufgrund ihrer negativen Hybridisierungsergebnisse virale DNA eines anderen Typs zu erwarten.

Bei 30 der untersuchten Warzen war der Virustyp zusätzlich durch Komplementbindungsreaktion (KBR) bestimmt worden (PFISTER, persönliche Mitteilung). Von 17 in der KBR als Typ Ia, Ib oder Ic charakterisierten Warzen zeigten 16 hohe oder sehr hohe Hybridisierungsraten, von 13 als Typ IV charakterisierten Exemplaren hatten 10 Hybridisierungsraten unter 1 %, eine lag knapp über 1 %. In 27 Fällen stimmten die Ergebnisse der beiden Untersuchungstechniken also überein, in 3 Fällen ergaben sich durch die KBR abweichende Befunde: Bei den in der KBR als Typ IV charakterisierten Exemplaren WV 764 b und c liegen die Hybridisierungsraten mit 3,6 bzw. 10,96 % deutlich über den sonst bei Typ IV registrierten, so daß entgegen dem Ergebnis der KBR eine Zuordnung zu Typ I naheläge. Bei WV 603 aus der Gruppe mit 26 bis 50 Partikeln erscheint angesichts der Hybridisierungsrate von 0,32 % das Vorliegen von Typ I (Ergebnis der KBR) unwahrscheinlich, um so mehr, als eine Wiederholung der Hybridisierung den ersten Wert bestätigte.

Aufgrund ihrer niedrigen Hybridisierungsraten bei hohen Partikelzahlen (größer als 12) oder ihrer Reaktion in der KBR wurden 21 % aller Warzen anderen Typen zugeordnet. Nachdem in den Gruppen mit niedrigen Partikelzahlen noch eine größere Anzahl von Warzen mit Typ-IV-DNA zu erwarten ist, erhöht sich dieser Anteil vermutlich noch deutlich. In den bisher durchgeführten Unter-

suchungen lag der Prozentsatz an Typ-IV-Warzen jedoch nur bei 20 %. Dies könnte als Anhaltspunkt dafür gewertet werden, daß ein Teil der in dieser Untersuchung als Typ IV bezeichneten nicht hybridisierenden Warzen in Wirklichkeit einem oder mehreren neuen , noch nicht klassifizierten Typen angehört, deren DNA ebenso wie die des Typs IV keine Gemeinsamkeiten mit denen der Typen Ia, b und c besitzt. Inzwischen ist in der Tat die Charakterisierung weiterer Warzentypen gelungen (COGGIN und ZUR HAUSEN 1979).

II) Serologie

Durch die elektronenmikroskopischen Agglutinationsversuche konnten bei 26 % der Seren von Papillomträgern und bei 34 % der Seren eines ausgewählten Normalkollektivs HPV-I-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich weder ein unterschiedliches Verhalten von Plantar- und Vulgärwarzen noch eine auffällige Altersverteilung der positiven Seren, wobei die verwendete Population sicher zu klein war, um in dieser Hinsicht gesicherte Aussagen machen zu können.

Wie bereits erwähnt, ist es im Nachhinein nicht möglich, festzustellen, welche HPV-Typen bei früheren Arbeiten über warzenspezifische Antikörper verwendet worden waren. Nachdem als Antigen meist gereinigtes Virusmaterial aus verschiedenen Warzen diente, sind wahrscheinlich häufig Mischungen von HPV-Typen verwendet worden, die sich in ihren Antigeneigenschaften zum Teil deutlich unterscheiden. Dies erklärt zwar die großen Unterschiede in den quantitativen Ergebnissen der verschiedenen Untersuchungen - der Anteil der positiven Seren schwankte zwischen 21 % (PASS et al. 1973) und 88 % (MORISON 1975 b) - macht aber auch einen Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit unmöglich.

In einer kürzlich durchgeführten Untersuchung lag der Prozentsatz der durch Radioimmunoassay nachweisbaren HPV-I-spezifischen Antikörper bei Warzenträgern und bei einem Normalkollektiv bei etwa 50 % und damit deutlich über den von uns gefundenen Werten, was wahrscheinlich hauptsächlich auf die größere Empfindlichkeit der dort verwendeten Nachweismethode zurückzuführen ist. Bei der Altersverteilung der positiven Seren zeigte sich in

dieser Untersuchung ein deutlicher Unterschied zwischen den Warzenträgern und dem nicht ausgewählten Vergleichskollektiv. Während bei den Patienten mit Warzen der Anteil der positiven Seren auch in den höheren Altersklassen hoch lag, erreichte beim Normalkollektiv der Prozentsatz der positiven Seren zwischen dem 11. und 20. Lebensjahr mit ca. 50 % ein Maximum, um dann allmählich auf etwa 25 % zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr abzufallen (PFISTER und ZUR HAUSEN 1978). Das bei Kindern und Jugendlichen beobachtete Überwiegen von Warzen des Typs HPV I geht also mit einem Anstieg der Antikörperkonzentration einher.

Um die Bedeutung humoraler Antikörper für den Verlauf von Warzeninfektionen einschätzen zu können, scheint es notwendig, noch einmal etwas ausführlicher auf Ergebnisse früherer serologischer Untersuchungen einzugehen.

HPV-spezifische Antikörper bei Warzenträgern waren seit dem Erstnachweis von ALMEIDA 1963 in unterschiedlichem Ausmaß von verschiedenen Untersuchern beobachtet worden. Es fiel jedoch schon bald auf, daß der Prozentsatz positiver Seren stark vom jeweiligen Zustand der Warzen abhängig war. OGILVIE fand mittels Präzipitationstest vor Beginn der spontanen Rückbildung der Warzen in 10 % Antikörper, während der Heilung stieg der Anteil der positiven Seren jedoch auf 68 %. In der KBR waren nur bei Patienten mit sich zurückbildenden Warzen Antikörper nachweisbar (OGILVIE 1970). Andere Untersuchungen bestätigten zwar, daß die Rückbildung von Warzen mit der Bildung von IgG-Antikörpern einhergeht, sie zeigten aber auch, daß zum Zeitpunkt der Regression eine kurzzeitige, zellgebundene Immunitätsreaktion auftrat und

daß bei Patienten mit langdauernden Warzeninfektionen ein Defekt der zellgebundenen Immunität vorliegt (WARWICK und MORISON 1975). Diese Ergebnisse sowie die Beobachtung, daß bei Kindern mit Warzen Tuberkulinteste signifikant seltener positiv ausfallen (BRODERSON et al. 1974) führte zu der von zahlreichen Autoren vertretenen Ansicht, daß zellgebundene Immunitätsreaktionen die auslösenden Faktoren bei der Regression seien (OGILVIE 1970). Unterstützt wurde diese Auffassung durch Untersuchungen von Tierpapillomen, deren Rückbildung sich aufgrund zellulärer Immunreaktionen vollzog (KREIDER 1963, LEE und OLSON 1969). Das Auftreten von Antikörpern wäre demnach nicht das auslösende Moment für die Regression, sondern eine Folge der sich bei der Rückbildung abspielenden Prozesse. Das virale Antigen, das nur in den keratinisierten Schichten der Epidermis vorzufinden ist (ALMEIDA et al. 1962), scheint zumeist keinen Anschluß an das humorale System zu besitzen und deshalb nicht imstande zu sein, die Produktion von Antikörpern hervorzurufen (ALMEIDA 1965, GOFFE 1965). Die subkutane Injektion von gereinigtem Warzenvirus bewirkt beim Meerschweinchen die Bildung von Antikörpern, während bei epithelialen Infektionen keine Antikörperbildung beobachtet wird (BLANK und HAINES 1976). Bei Entzündungen und Traumen im Verlauf von Warzeninfektionen ebenso wie bei Regression wird demnach durch die verstärkte Durchblutung und durch die Zerstörung von Zellen eine größere Antigenmenge freigesetzt und die Bildung von Antikörpern angeregt.

Aufgrund weiterer Untersuchungsergebnisse messen andere Autoren dem Auftreten von Antikörpern eine wesentlich größere Bedeutung für den Verlauf von Warzeninfektionen bei. PYRHÖNEN stellte fest, daß bei Anwesenheit von

komplementbindenden Antikörpern (IgG) Spontanheilung sehr wahrscheinlich war. Sie erfolgte in 94 % der Fälle innerhalb weniger Wochen nach Auftreten der IgG. Dagegen trat nur bei 46 % der Warzenträger ohne IgG innerhalb des gleichen Zeitraums Heilung ein (PYRHÖNEN und JOHANSSON 1975). MATTHEWS untersuchte mit Hilfe immunfluoreszenzmikroskopischer Methoden Gewebeschnitte von Warzen und fand bei persistierenden Warzen in 12 % IgM und keine IgG, bei den Warzen, die gerade abheilten, jedoch in 100 % IgM, in 97 % IgG und in 80% IgA-Antikörper. Er beobachtete außerdem in 83 % der sich zurückbildenden Warzen, aber nur in 43 % der anderen neben antiviralem IgM auch antizelluläres IgM. Diese antizellulären Antikörper traten vor den antiviralen auf, woraus er folgerte, daß dem antiviralen Antikörperanstieg während der Regression eine Reaktion gegen Warzenzellen vorausgehen muß. Bei seinen Gewebeuntersuchungen fand er in abheilenden Warzen keine zellulären Infiltrate, seiner Meinung nach ein Beweis dafür, daß nicht zellgebundene sondern humorale Immunitätsreaktionen für die Rückbildung von Warzen verantwortlich sind. Ein entscheidender Mechanismus scheint dabei die Reaktion zwischen Antikörpern und Antigen in den Blutgefäßen zu sein, die zu charakteristischen intravaskulären Thromben in abheilenden Warzen führt (MATTHEWS und SHIRODORIA 1972).

Die Antikörperbildung setzt offensichtlich erst einige Monate nach Beginn der Warzeninfektion ein; die höchsten Titer werden zwischen dem 6. und 12. Monat erreicht (CUBIE 1972), in dem Zeitraum also, in dem auch die höchsten Partikelzahlen in den Warzen gefunden werden (BARRERA-ORO et al. 1962). Diese Antikörper sind noch Jahre nach Verschwinden der Warzen nachweisbar, wobei

Stärke und Dauer der Antikörperantwort davon abhängig waren, ob Plantar- oder Vulgärwarzen vorgelegen hatten. Bei einer Untersuchung einer Schülerpopulation zeigten immerhin noch über 35 % der früheren Plantar- und knapp 20 % der früheren Vulgärwarzenträger virusspezifische Antikörper. In einem Fall waren noch 13 Jahre nach einer Verruca-vulgaris-Infektion Antikörper vorhanden (CUBIE 1972).

Bei einer epidemiologischen Studie an 500 Patienten mit Vulgärwarzen fiel auf, daß in der Gruppe, deren Warzen nicht länger als 3 Monate bestanden, 30 % multiple Warzen hatten, in der Gruppe von 3 bis 6 Monaten 50 % und in der Gruppe, in der die Warzen bereits länger als 6 Monate existierten, 63 % multiple Warzen zeigten. Bei Zweitinfektionen war die Zahl der multiplen Warzen wesentlich höher als bei Erstinfektionen (RULISON 1942). Auch PYRHÖNEN stellte fest, daß die Tumorzahl mit der Dauer der Infektion zunahm und daß die Antikörperspiegel der Warzenträger der Dauer der Infektion und der Zahl der Warzen umgekehrt proportional waren (PYRHÖNEN und JOHANSSON 1975).

Angesichts dieser Befunde scheint also unabhängig von der Frage nach den für die Regression letztlich ausschlaggebenden Mechanismen die Höhe des Antikörpertiters eng mit dem Verlauf der Warzeninfektion verknüpft zu sein. Eine Aussage über die Bedeutung humoraler Antikörper für den Schutz vor Neuinfektionen läßt sich aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchungen jedoch nicht treffen, da wir jetzt wissen, daß aufeinanderfolgende Infektionen verschiedener, nicht kreuzreagierender HPV-Typen durchaus denkbar sind.

Auch bei unseren Untersuchungen war nicht bekannt, welcher HPV-Typ in den entfernten Warzen vorgelegen hatte, ob also die gemessenen HPV-I-Titer auf diese letzte Infektion zurückzuführen sind oder auf früher durchgemachte Infektionen. Für konkrete Aussagen müßte zunächst der Typ der entfernten Warze untersucht und dann der entsprechende Antikörperspiegel bestimmt werden.

Mehrere bis jetzt unerklärbare Phänomene erscheinen angesichts der Entdeckung verschiedener, nicht kreuz-reagierender HPV-Typen in einem neuen Licht, so etwa die Beobachtung, daß sich bei einigen Patienten alle Warzen zur gleichen Zeit zurückbilden, während bei anderen nur einige Warzen abheilen oder sich zur gleichen Zeit sogar neue entwickeln, oder die Beobachtung, daß bei einigen Patienten trotz nachgewiesener hoher IgG-Spiegel Neuinfektionen erfolgen. Beides wäre mit dem Vorliegen verschiedener Warzentypen bzw. Antikörperspiegel zu erklären.

Es sollte Aufgabe weiterführender Untersuchungen sein, den Prozentsatz an Seren mit Antikörpern gegen andere HPV-Typen festzustellen, zu klären, wie stark die Antikörperproduktion jeweils stimuliert wird und ob der Verlauf der Infektion jeweils unterschiedlich ist. Auch die Frage nach der unterschiedlichen biologischen Wirksamkeit der einzelnen Typen läßt sich im Augenblick noch nicht beantworten.

Zusammenfassung

Bei 75 Plantar- und Vulgärwarzen wurde elektronenmikroskopisch die Konzentration (Partikelzahl pro Gesichtsfeld) der in ihnen enthaltenen Viruspartikel festgestellt und Hybridisierungen der zellulären DNA mit cRNA des Humanen Papillomvirus (HPV)-Typ I durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß generell die Hybridisierungsrate als Maß für die Anzahl viraler Genomäquivalente mit der Partikelzahl zunahm. Bei Plantarwarzen wurden jedoch bei gleicher Partikelzahl im Durchschnitt höhere Hybridisierungsraten als bei Vulgärwarzen gefunden.

Das Vorliegen von HPV-Typ I wurde bei Hybridisierungsraten von mehr als 5 % angenommen. Insgesamt war dies bei 32 % der Warzen der Fall, mit 41 % bei den Plantarwarzen deutlich häufiger als bei den Vulgärwarzen mit 19 %. Die Altersgruppe der 5-15-jährigen war bei den HPV-I-Warzen deutlich überrepräsentiert: 60 % von ihnen stammten aus dieser Altersgruppe.

Bei 7 Warzen konnte aufgrund hoher Partikelzahl bei negativem Hybridisierungsergebnis das Vorliegen von HPV-Typ I ausgeschlossen werden.

Weiterhin wurden die Seren von 50 Papillomträgern mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Agglutination auf HPV-I-spezifische Antikörper untersucht und mit einer Normalpopulation von gleicher Anzahl und Altersverteilung verglichen. Dabei konnten bei den Papillomträgern in 26 % und bei den Vergleichsseren in 34 % HPV-I-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Die

Aufteilung auf Plantar- und Vulgärwarzenträger sowie die Altersverteilung waren unauffällig.

Tabelle 1: Ergebnisse der Hybridisierungen

WV-Nr.	Typ	Alter des Pat.	Partikel- zahl	Hybr.rate in %	HPV-Typ in KBR
521	V	21	o	0,00	
529	V	38	o	0,28	
566	P	67	o	0,24	
673	V	13	o	0,00	
744	P	10	o	0,21	
758	P	25	o	0,11	
772	P	47	o	0,05	
783	P	17	o	1,43	
805	P	25	o	0,13	
895	P	36	o	0,01	
589b	P	12	1-2	17,14 x	
598a	V	12	1-2	1,65	
737	V	10	1-2	18,05	
753	P	21	1-2	14,65	1
796	P	23	1-2	3,18	
821	P	36	1-2	19,08	
967a	P	18	1-2	0,02	
475	P	23	3-5	0,47	
512	P	45	3-5	0,00	
519	V	45	3-5	0,27	
524	P	25	3-5	2,46	
568	P	55	3-5	0,00	
579	P	13	3-5	9,99	
590	V	10	3-5	0,44	
698	V	15	3-5	0,29	
741	V	37	3-5	4,63	1
745	P	17	3-5	0,04	4

WV-Nr.	Typ	Alter des Pat.	Partikel- zahl	Hybr.rate in %	HPV-Typ in KBR
747	V	45	3-5	0,98	
748	V	61	3-5	0,44	4
752c	V	18	3-5	0,35	4
764b		23	3-5	3,66	4
764c		23	3-5	10,96	4
806	P		3-5	0,35	
826	P	25	3-5	0,05	
915	P	11	3-5	0,93	
930	P	18	3-5	29,06	
932b	V	60	3-5	0,02	4
937	V	49	3-5	0,11	4
977	P	28	3-5	0,00	4
434	V	21	6-12	0,06	
443	V	18	6-12	1,15	4
460	V	9	6-12	0,04	
493	V	27	6-12	0,07	
508	V	12	6-12	0,00	
525	V	26	6-12	1,78	
565	P	8	6-12	1,78	
599	V	17	6-12	0,55	
697	P	40	6-12	0,00	4
708	P	15	6-12	22,14	1
768			6-12	0,19	
837	P	38	6-12	0,00	
914	V	21	6-12	0,32	4
454	P	13	13-25	13,32 x	
463	V	37	13-25	6,45	
932a	V	60	13-25	0,02	4
933	V	12	13-25	0,63	

WV-Nr.	Typ	Alter des Pat.	Partikel- zahl	Hybr.rate in %	HPV-Typ in KBR
453	V	16	26-50	0,39	
477	P	11	26-50	18,99	1
567	P	6	26-50	12,05 x	1
603	P	23	26-50	0,32	1
704	V	19	26-50	0,07	
711	P	11	26-50	22,19 x	1
743	P	34	26-50	28,66 x	
799	P	25	26-50	0,06	
816	P	16	26-50	0,14	4
494	P	11	51-100	22,51	1
523	V	12	51-100	13,66	1
578	V	10	51-100	8,44	1
589a	P	12	51-100	6,39	1
696	V	9	51-100	23,45 x	1
739	V	8	51-100	22,58 x	1
754b	P	18	51-100	23,66	1
898	P	13	51-100	24,36	1
899	P	16	51-100	18,09 x	1
936	P		51-100	23,10	1

Die Hybridisierungsraten mit HPV-I-cRNA sind in Prozent der eingegebenen Radioaktivität angegeben. Bei mit "x" gekennzeichneten Werten war eine geringere als die übliche DNA-Menge verwendet worden ohne eine Umrechnung durchzuführen (siehe Text). Die letzte Spalte zeigt die Ergebnisse der bei einigen Warzen durchgeführten Komplementbindungsreaktion (KBR) (PFISTER, persönliche Mitteilung).

Tabelle 2: Ergebnisse der EM-Agglutinationsversuche

a) Seren der Warzenträger

WV-Nr.	Typ	Alter des Pat.	Serumverdünnung	
			1:10	1:100
9	P	13	-	-
10	P	29	-	-
24	P	81	-	-
25	P	5	-	-
27	V+P	30	-	-
31	V		-	-
38	P	19	-	-
40	P	24	-	-
43	P	30	-	-
44	V	24	-	-
47	P	22	-	-
48	V	34	-	-
97	V	13	-	-
98	V	48	-	-
106	V	19	+	+
148	V	19	+	+
178	V	26	-	-
189	V	25	-	-
195	V	17	-	-
196	P		-	-
211	V	22	+	+
219		17	-	-
254	V	18	-	-
259	V	53	-	-
327	V	24	-	-
332	P	20	+	+

WV-Nr.	Typ	Alter des Pat.	Serumverdünnung	
			1:10	1:100
336	V	31	-	-
390	V	62	+	-
393	V	18	-	-
394	V	19	-	-
396	V	22	-	-
397	V	23	-	+
402	V	25	-	-
404	V	26	+	-
405	V	15	-	-
421	V	33	-	-
444	P	16	-	+
464	P	14	-	-
478	V	23	-	-
729	V	7	+	-
799	P	25	-	-
929	V	21	+	+
931	P	30	+	-
949	V	25	-	-
966	V	49	-	-
978	V	20	-	-
980		66	+	+
1053	V	26	-	-
1220	V	19	+	-
1236	V	16	-	-

b) Kontrollserien

Nr.	Alter des Pat.	Serum- verdünnung		Nr.	Alter des Pat.	Serum- verdünnung	
		1:10	1:100			1:10	1:100
561	17	-	-	4225	20	-	-
599	53	-	-	4247	62	-	+
627	31	-	+	4374	18	-	-
755	48	-	-	4409	22	-	-
1238	30	-	-	4914	5	-	-
1256	49	-	+	5284	30	+	-
1358	33	-	-	5290	16	+	+
1599	30	-	-	5690	34	+	-
1968	17	-	-	5714	16	+	+
1983	19	-	+	5916	25	-	-
2176	80	+	-	5917	15	+	-
2179	13	-	-	6045	30	-	-
2674	26	-	-	6125	37	+	-
2909	66	-	-	6148	20	-	-
2956	23	+	-	6189	13	+	+
3003	14	-	+	6/043	19	-	-
3184	25	-	-	6/045	7	-	-
3190	25	-	-	6/097	29	-	-
3308	19	-	-	6/899	26	-	-
3405	21	-	+	8/321	24	-	-
3449	25	-	-	9/090	22	-	-
3516	26	-	-	9/163	24	-	-
3862	18	-	-	9/181	25	-	+
3967	19	+	-	9/224	22	-	-
4060	23	-	-	9/239	24	-	-

Literatur

ALMEIDA, J., B. CINADER und A. HOWATSON (1963): The structure of antigen-antibody complexes. A study by electron microscopy.

J. Exptl. Med., 118, 327-340

ALMEIDA, J.D. und A.P. GOFFE (1965): Antibody to wart virus in human sera demonstrated by electron microscopy and precipitin tests.

Lancet, 2, 1205-1207

ALMEIDA, J.D., J.D. ORIEL und L.M. STANNARD (1969): Characterisation of the virus found in human genital warts.

Microbios, 3, 225-232

BARRERA-ORO, J.G., K.O. SMITH und J.L. MELNICK (1962): Quantitation of papova virus particles in human warts.

J. Natl. Cancer Inst., 29, 583-595

BENZ, U. und F. GILLIET (1976): Untersuchung über mögliche kausale Faktoren bei epidemischer Häufung von Plantarwarzen.

Schweiz. Med. Wschr., 106, 666-671

BLANK, H. und H. HAINES (1976): Viral diseases of the skin, 1975: a 25-year perspective.

J. Invest. Dermatol., 67, 169-176

BOSSE, K. und E. CHRISTOPHERS (1964): Beitrag zur Epidemiologie der Warzen.

Hautarzt, 15, 80-86

BRENNER, S. und R.W. HORNE (1959): A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses.

Biochim. Biophys. Acta 34, 103-110

BRODERSON, J., J. GENNER und H. BRODTHAGEN (1974): Tuberculin sensitivity in BCG vaccinated children with common warts.

Acta dermato-venerologica 54, 291-292

COGGIN, J.R.jr. und H. ZUR HAUSEN (1979): Workshop on papilloma viruses and cancer.

Cancer Res. 39, 545-546

CRAWFORD, L.V. (1965): A study of human papilloma virus DNA.

J. Mol. Biol. 13, 362-372

CUBIE, H.A. (1972): Serological studies in a student population prone to infection with human papilloma virus.

J. Hygiene Cambridge 70, 677-690

EAST ANGLICAN BRANCH OF THE SOCIETY OF MEDICAL OFFICERS OF HEALTH (1955): The incidence of warts amongst school children in East Anglia.

Med. Officer 94, 55-59

FAVRE, M., F. BREITBURD, O. CROISSANT und G. ORTH (1975): Structural polypeptides of rabbit, bovine and human papilloma viruses.

J. Virol. 15, 1239-1247

FREY, E. (1924): Zur Frage der ätiologischen Beziehungen der Warzen und spitzen Kondylome.

Schweiz. Med. Wschr., 5, 215-219 und 239-243

FRIEDMAN, J.M. und Ph.J. FIALKOW (1976): Viral "tumorigenesis" in man: cell markers in condylomata acuminata.

Int. J. Cancer, 17, 57-61

GISSMANN, L. und H. ZUR HAUSEN (1976): Human papilloma viruses: physical mapping and genetic heterogeneity.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 1310-1313

GISSMANN, L., H. PFISTER und H. ZUR HAUSEN (1977): Human papilloma viruses (HPV): Characterisation of 4 different isolates.

Virology, 76, 569-580

GOFFE, A.P., J.D. ALMEIDA und F. BROWN (1966): Further information of the antibody response to wart virus.

Lancet, 2, 607-608

GOLDSCHMIDT, H. und A.M. KLIGMAN (1958): Experimental inoculation of humans with ectodermotropic viruses.

J. Invest. Dermatol., 31, 175-182

ISHIKAWA, K. (1936): Klinische und experimentelle Untersuchungen über die Entstehungsursachen der Papillome.

Fukuoka Acta Med., 29, 87-88

KREIDER, J.W. (1963): Studies of the mechanism responsible for spontaneous regression of the Shope rabbit papilloma.

Cancer Res., 23, 1593-1597

LANCASTER, W.D. und W. MEINKE (1975): Persistence of viral DNA in human cell cultures infected with human papilloma virus.

Nature (London), 256, 434-436

LEE, K.P. und L. OLSON (1969): Precipitin response of cattle to bovine papilloma virus.

Cancer Res., 29, 1393-1397

MASSING, A.M. und W.L. EPSTEIN (1963): Natural history of warts. A two year study.

Arch. Dermatol., 87, 306-310

MATTHEWS, R.S. und P.V. SHIRODORIA (1973): Study of regressing warts by immunofluorescence.

Lancet, 1, 689-691

MEESSEN, H. und H. SCHULZ (1957): Elektronenmikroskopischer Nachweis des Virus im Kehlkopfpapillom des Menschen.

Klin. Wschr., 35, 771-773

MELCZER, N. (1965): Über die ätiologische Identität der gewöhnlichen Warzen und spitzen Kondylome.

Hautarzt, 16, 150-153

MORISON, W.L. (1975a): In vitro assay of immunity to human wart antigen.

Brit. J. Dermatol., 93, 545-551

MORISON, W.L. (1975b): Cell-mediated immune responses in patients with warts.

Brit. J. Dermatol., 93, 553-556

MURRAY, R.F., J. HUBBS und B. PAYNE (1971): Possible clonal origin of common warts (*verruca vulgaris*).
Nature, 232, 50

NASEMANN, Th. (1974): Viruskrankheiten der Haut, der Schleimhäute und des Genitales.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

OGILVIE, M.M. (1970): Serological studies with human papova (wart) virus.
J. Hygiene Cambridge, 68, 479-483

PASS, F. und J.V. MAIZEL (1973): Wart-associated antigens. II. Human immunity to viral structural proteins.
J. Invest. Dermatol., 60, 307-311

PASS, F. und D.M. MARCUS (1973): Wart-associated antigens. I. Isolation of tissue antigens using antibody immunoadsorbents.
J. Invest. Dermatol., 60, 301-306

PASTINSZKY, S. (1958): Beiträge zur Epidemiologie der Sohlenwarzen.
Dermatol. Wschr., 37, 1014-1019

PFISTER, H. und H. ZUR HAUSEN (1978): Seroepidemiological studies of human papilloma virus (HPV-1) infections.
Int. J. Cancer, 21, 161-165

PYRRHÖNEN, S. und E. JOHANSSON (1975): Regression of warts. An immunological study.
Lancet, 15, 592-596

PYRRHÖNEN, S. und K. PENTTINEN (1972): Wart virus antibodies and the prognosis of wart disease. Lancet, 2, 1330-1332

RADLOFF, R.W., W. BAUER und J. VINOGRAD (1967): A dye-boyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed circular DNA in HELA cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 1514-1521

ROBINSON, R.A. und R.H. STOKES (1955): Electrolyte solutions. Acad. Press, New York

ROWSON, K.E.K. und B.W.J. MAHY (1967): Human papova (wart) virus. Bacteriol. Rev., 31, 110-131

RULISON, R.H. (1942): Warts. A statistical study of 921 cases. Arch. Dermatol. Syphilol., 46, 66-81

SERRA, A. (1924): Studi sul virus della verruca, del papilloma, del condiloma acuminato (etiologia, patogenesi, filtrabilita): nota preventiva. Giorn. Ital. Mal. Venereol., 65, 1808-1814

SOBER, H. (ed.) (1970): Handbook of Biochemistry. Chemical Rubber Co., Cleveland

STARKE, G. und P. HLINAK (1972): Grundriss der allgemeinen Virologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

TAI, H.R., C.A. SMITH, P.A. SHARP und J. VINOGRAD (1972):
Sequence heterogeneity in closed simian virus 40
desoxyribonucleic acid.

J. Virol., 2, 317-325

TOOZE, J. (ed.) (1973): The molecular biology of
tumor viruses.

Cold Spring Harbor Laboratory

ULLMAN, E.V. (1923): On the aetiology of the laryngeal
papilloma.

Acta Oto-Laryngol., 5, 317-334

WEIGLE, J.M., M. MESELSOHN und K. PAIGEN (1959): Density
alteration associated with transducing ability in the
bacteriophage Lambda.

J. Mol. Biol., 1, 379-386

WOLF, H. (1974): Untersuchungen zur Regulation der
Epstein-Barr Virus-Synthese und zum Nachweis viraler
Nukleinsäure in Tumormaterial.

Dissertation. Naturwissenschaftliche Fakultät der
Julius-Maximilian-Universität, Würzburg

WAELESCHE, L. (1918): Übertragungsversuche mit spitzen
Kondylomen.

Arch. Dermatol. Syphilol., 124, 625-646

ZUR HAUSEN, H., L. GISSMANN, W. STEINER, W. DIPPOLD
und I. DREGER (1975): Human papilloma viruses and
cancer.

Bibl. Haematologica, 43, 569-571

ZUR HAUSEN, H., W. MEINHOF, W. SCHREIBER und G.W. BORNKAMM (1974): Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridisations with complementary RNA of human wart virus. Int. J. Cancer, 13, 650-656

ZUR HAUSEN, H. und H. SCHULTE-HOLTHAUSEN (1970): Presence of EB Virus Nucleic Acid in a "virus-free" line of Burkitt tumor cells. Nature, 227, 245-248

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Professor zur Hausen für die Überlassung des Themas und seine ständige freundliche Bereitschaft, anfallende Probleme zu diskutieren und mich bei deren Bewältigung zu unterstützen.

Den Mitgliedern des Instituts für Klinische Virologie danke ich für die erfreuliche Zusammenarbeit, insbesondere Herrn Dr. L. Gissmann und Frau G. Menzel, die mir bei der praktischen Durchführung halfen.

Lebenslauf

- 2.2.1953 als Tochter des Ingenieurs Georg Dreger
 und seiner Ehefrau Marianne, geb.
 Seemann, in Roth bei Nbg. geboren
- Sept. 1959 - Besuch der Volksschule Roth
Juli 1966
- Sept. 1966 - Besuch des Wolfram-von-Eschenbach-
Juni 1972 Gymnasiums Schwabach
- Okt. 1972 - Studium der Medizin an der Friedrich-
Mai 1979 Alexander-Universität Erlangen
- 26.5.1977 Heirat mit dem Medizinstudenten Karl
 Herholz
- 25.5.1979 Approbation als Arzt
- seit Juni 1979 Wissenschaftliche Angestellte (Assistenz-
 ärztin) an der Universitätsnervenklinik
 Erlangen

Ingrid Herholz

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197